

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-250671

(43) 公開日 平成7年(1995)10月3日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/20	A	8828-4B		
// C 1 2 P 7/60		8114-4B		
(C 1 2 N 1/20				
C 1 2 R 1:38)				
(C 1 2 P 7/60				

審査請求 有 発明の数 1 O L (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平7-48208
(62) 分割の表示	特願昭62-133113の分割
(22) 出願日	昭和62年(1987)5月28日
(31) 優先権主張番号	特願昭61-131121
(32) 優先日	昭61(1986)6月5日
(33) 優先権主張国	日本 (J P)

(71) 出願人	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(71) 出願人	000173898 財団法人発酵研究所 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
(72) 発明者	今井 紘 大阪府高槻市南平台5丁目33番20号
(72) 発明者	坂根 健 大阪府吹田市新芦屋上29番K-704号
(72) 発明者	野上 ▲いく▼雄 京都府長岡京市うぐいす台39番地の4
(74) 代理人	弁理士 青山 葆 (外1名)

(54) 【発明の名称】 2-ケート-レーグロン酸生成菌

(57) 【要約】

【目的】 新規2-ケート-レーグロン酸生成菌の提供。

【構成】 極鞭毛を2本以上有する運動性桿菌で、グリセロールからジハイドロオキシアセトンを生産せず、イソアレンユニット数10のユビキノンを有し、生育にチアミン、リボフラビン、およびパントテン酸を必須に要求するシュードモナス・ソルボソキシダンス。

【効果】 レーソルボースから2-ケート-レーグロン酸を収率よく与える。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 極鞭毛を2本以上有する運動性桿菌で、グリセロールからジハイドロオキシアセトンを生産せず、イソブレンユニット数10のユビキノンを有し、生育にチアミン、リボフラビン、およびパントテン酸を必須に要求するシュードモナス・ソルボソキシダンス。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ビタミンC(Ｌ-アスコルビン酸)の合成前駆体として有用な2-ケトー-Ｌ-グルコン酸を生成する細菌に関する。

【0002】

【従来の技術】ビタミンC合成前駆体として有用な2-ケトー-Ｌ-グルコン酸は、ライヒシュタイン法[ヘルベチカ・キミカ・アクタ(Helvetica Chimica Acta)第17巻、311頁(1934)]によって工業的に生産されてきた。しかし、この方法は工程数が多く、全体としての収率の向上が期待できないため、もっと有効な生産方法を見出すことが必要になってきた。ライヒシュタイン法に代わる方法として、微生物により、グルコースから5-ケトー-グルコン酸を生成し、これを化学的または微生物によりイドン酸とし、更にこれを微生物的に酸化して2-ケトー-Ｌ-グルコン酸に導く方法(米国特許第2,421,611号)やグルコースから微生物により2,5-ジケトー-Ｄ-グルコン酸を生成し、化学的または、微生物により2-ケトー-Ｌ-グルコン酸に還元する方法(特公昭39-14493号、特公昭53-25033号、特公昭56-15877号、特公昭59-35920号)が検討されてきた。しかし、これらの方法に用いられる化学的還元工程は、立体特異的でなく、前者ではD-グルコン酸を、後者では、2-ケトー-Ｄ-グルコン酸を副生し収率の低下をきたす。また、この工程を微生物により行う場合は、還元エネルギー源として余分の炭素源を供給せねばならない。

【0003】また、Ｌ-ソルボースを出発原料として2-ケトー-Ｌ-グルコン酸を製造する方法が知られており、この場合は、酸化工程のみで、還元工程を含まずに製造できる。この方法の例として今までに、グルコノバクター(Gluconobacter)属、シュードモナス属、セラチア(Serratia)属、アクロモバクター(Achromobacter)属、アルカリゲネス(Alcaligenes)属の細菌を用いた方法が知られている[バイオテクノロジー・アンド・バイオエンジニアリング(Biotechnology and Bioengineering)第14巻、799頁(1972)、特公昭41-159号、特公昭41-160号、米国特許第3,043,749号、特公昭49-39838号、中国微生物学報、第20巻、第246頁(1980)および第21巻、第185頁(1981)、ソ連特許第526,660号参照]。しかし、これまでに公表されている菌株によるＬ-ソルボースからの2-ケトー-Ｌ-グルコン酸の生成収率

は極めて低く、到底工業的に利用し得るものではなかった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、Ｌ-ソルボースから高収率で2-ケトー-Ｌ-グルコン酸を生成する微生物株を得るため、日本国内で採取した土壌試料から多数の菌株を分離し、検索した結果、従来の知見を遥かに上回る収率(消費糖当り約80%)を示す細菌、分離菌株番号526-21、526-22および526-42の3菌株を見出した。これら3菌株について鋭意研究を行い、今までに知られていないシュードモナス属の新菌種であることを見出し、本発明を完成した。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、極鞭毛を2本以上有する運動性桿菌で、グリセロールからジハイドロオキシアセトンを生産せず、イソブレンユニット数10のユビキノンを有し、生育にチアミン、リボフラビン、およびパントテン酸を必須に要求するシュードモナス属の新菌種であるシュードモナス・ソルボソキシダンスを提供するものである。

【0006】本発明の細菌は、シュードモナス・ソルボソキシダンスに属し、Ｌ-ソルボースを2-ケトー-Ｌ-グルコン酸に酸化する能力を有する微生物であり、該微生物またはその処理物を、Ｌ-ソルボースと接触させて、2-ケトー-Ｌ-グルコン酸を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする2-ケトー-Ｌ-グルコン酸の製造法に用いることができる。

【0007】本発明者らが見出した3菌株の分類学的性状は、次の通りである。

(a)形態

- (1)桿菌。0.3~0.5×0.7~1.4μm。
- (2)多形性は認められない。
- (3)運動性があり、2本以上の極鞭毛有する。
- (4)胞子を形成しない。
- (5)グラム陰性。
- (6)非抗酸性。

【0008】(b)生育の状態

- (1)肉汁寒天平板培養：生育中程度。円形、全縁、平滑、乳白色の集落を形成する。
- (2)肉汁寒天斜面培養：生育中程度。糸状、平滑、乳白色。
- (3)肉汁液体培養：生育中程度。沈澱を生じる。
- (4)肉汁ゼラチン穿刺培養：上部のみ生育するが、ゼラチンを液化しない。
- (5)リトマスミルク：酸性化するが、凝固、分解は認められない。

【0009】(c)生理学的性質

- (1)硝酸塩の還元は微弱。
- (2)脱窒反応陰性。
- (3)メチルレッド(MR)テストは弱陽性。

10

20

30

40

50

- (4) フォーゲス・プロスカウエル(VP)テストは弱陽性。
 (5) インドールを生成しない。
 (6) 硫化水素を生成しない。
 (7) デンブンの加水分解は陰性。
 (8) クエン酸の利用性は陰性。
 (9) アンモニウム塩を窒素源として利用できる。
 (10) 色素の生成は認められない。
 (11) ウレアーゼ陽性。
 (12) オキシダーゼ陽性。
 (13) カタラーゼ陽性。
 (14) 15~36℃で生育し、至適生育温度は30℃付近。pH 5.5~8.7で生育し、至適生育pHは6.0~7.5。
 (15) 好氣的。
 (16) ヒュー・ライフソンのOFテストは酸化的。
 (17) L-アラビノース、D-キシロース、D-グルコース、D-マンノース、D-フラクトース、D-ガラクトース、麦芽糖、しょ糖、乳糖、トレハロースから微弱に酸を生成するが、ガスは生成しない。D-ソルビット、D-マンニット、イノシット、グリセリン、デンブンから酸、ガスを生成しない。
 【0010】(d)その他の性質
 (1) DNAのグアニンとシトシン含量は約67モル%である。
 (2) イソプレヌユニット数10のユビキノンを有する。
 (3) グリセロールからジハイドロオキシアセトンを生成しない。

分離菌株番号	FRI受託番号	I FO受託番号
526-21	FERM P-8750 (FERM BP-1334)	I FO 14501
526-22	FERM P-8751 (FERM BP-1335)	I FO 14502
526-42	FERM P-8752 (FERM BP-1336)	I FO 14503

【0012】本発明の菌株としては、上記した3菌株は勿論のこと、3菌株を紫外線やX線を照射したり、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(ニトロソグアニジン)、メチルメタンサルホン酸、ナイトロジェンマスタードのような変異誘起剤で処理して得られる変異株も有利に用いられる。その例としてシュードモナス・ソルボソキシダンス526-21からニトロソグアニジン処理によって誘導されたSB-15株を挙げることができる。SB-15株はL-ソルボースから2-ケト-L-グルコン酸生成能が増強されている他は、親株である526-21株と同じ分類学的性質を示した。また、該SB-15株は、昭和62年4月23日にI FOに受託番号I FO 14604として、昭和62年5月1日にFRIに受託番号FERM BP-1356とそれぞれ寄託された。前記菌株のいずれかを、L-ソルボース※50

* (4) 生育にチアミン、リボフランビン、パントテン酸を必須に要求し、ビオチン、カザミノ酸により生育を促進される。

【0011】以上の分類学的性状を、バーギーズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリオロジー(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)第1巻(1984年)に照合してみると、これら菌株はいずれも、グラム陰性、極鞭毛を有する運動性桿菌で、好気性、オキシダーゼ陽性であることから、シュードモナス属の細菌種と考えるのが妥当である。生育にビタミン、アミノ酸を要求すること、DNAのグアニンとシトシンの含量が67モル%であることから、この属のセクションIVに分類される。また、イソプレヌユニット数10のユビキノンを有することから、このセクションのシュードモナス・ディミニユータ(*Pseudomonas diminuta*)およびシュードモナス・ベシキュラリス(*Pseudomonas vesicularis*)に近縁な種と考えられる。しかしながら、鞭毛の着生数、糖の資化性等で、前記2菌株と異なり、シュードモナス属の既知種の中に該当するものを見出すことができず、この属の新菌種と判断した。そこでこれら3菌株をシュードモナス・ソルボソキシダンス(*Pseudomonas sorbosoxidans*)と命名し、昭和61年(1986年)4月11日に財団法人発酵研究所(I FO)に、また昭和61年(1986年)4月26日に通商産業省工業技術院微生物工業技術研究(FRI)に寄託した。これらの3菌株は、その後、昭和62年4月3日にブタベスト条約の下FRIに寄託した。3菌株の分離番号と菌株保存機関の受託番号は次の通りである。

※スを含む培地で培養してもよく、またL-ソルボースに前記菌株の菌体処理物を作用させてもよい。

【0013】本明細書中で用いる「菌体処理物」とは、前記の菌株のいずれかを培養して得られる培養物の洗浄菌体、アセトンパウダー、ポリアクリルアミドゲルまたは、K-カラギーナン包括固定菌体等をいう。原料のL-ソルボースは、培養当初から、使用する全量を培地に加えてもよいし、何回かに分けるかまたは、連続的に培養液に加えてもよい。L-ソルボースと前記細菌とを接触させて行う反応では、L-ソルボースの濃度は、培地に対して3~30%(W/V)、好ましくは、5~25%(W/V)である。L-ソルボースと菌体処理物とを接触させる方法としては、例えば、菌体処理物にL-ソルボース、2-(N-モルフォリノ)エタンサルホン酸(MES)緩衝液(0.5M、pH 6.5)およびCaCO₃を加え、

水で希釈して三角フラスコ中で振盪させる方法が挙げられる。L-ソルボースと前記菌体処理物を接触させて行う反応のL-ソルボースの濃度は0.1~10%(W/V)、好ましくは0.3~3%(W/V)であり、菌体処理物の量は、処理前の乾燥菌体として1~30mg/ml、好ましくは3~20mg/mlである。反応液のpHは、5.5~7.5に調製され、反応温度は約20~40℃、反応時間は約1~100時間である。

【0014】前記細菌株の培養に用いられる培地は、これらが利用し得る栄養源を含むものであれば、液状でも固体状態でもよいが、大量のものを得るときには、液体培地を用いるのが好ましい。該培地には、通常微生物の培養に用いられる炭素源、窒素源、無機塩類、有機酸塩および微量栄養素が用いられる。炭素源としては、原料であるL-ソルボースを使用できるが、補助炭素源として、例えばグルコース、グリセリン、ショ糖、乳糖、麦芽糖、糖蜜等が使用される。窒素源としては、例えばアンモニウム塩、コーンステープリカー、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、綿実粕、尿素等の無機および有機の窒素含有物が挙げられる。また、無機塩類としては、カリウム、ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、鉄、マンガン、コバルト、亜鉛、銅および燐の塩類が用いられる。微量栄養素としては、前記細菌株の生育必須あるいは促進因子である、ビオチン、チアミン、リボフラビン、パントテン酸およびアミノ酸類、またはこれらを含む天然物として適宜加えられる。培養の手段は、静置培養でも、振盪培養あるいは通気攪拌培養法等の手段を用いてもよいが、大量の処理は、いわゆる深部通気攪拌培養によるのが望ましい。

【0015】培養条件は、使用する菌株、培地の組成、その他によっても異なり、要するに目的物が最も効率よく生産されるように、個々の場合に応じて選択すればよい。例えば、培養は25~35℃において行うのがよく、培地のpHは5~9程度が望ましい。以上のような条件下で、10~120時間培養することにより、2-ケト-L-グルコン酸が最高濃度に蓄積される。なお、この場合、目的物の生成に伴ってpHが低下するのが一般的であるので、適当な塩基性物質、例えば苛性ソーダ、苛性カリ、アンモニア等を添加して、常に微生物の2-ケト-L-グルコン酸生成に最も適したpHに保持するのもよく、また培地中に適当な緩衝剤を添加して、最適なpHが保持されるようにするのもよい。

【0016】このようにして、培養液中、または反応液中に生成、蓄積された2-ケト-L-グルコン酸は、その性状を利用したそれ自体公知の手段で分離、精製することができる。2-ケト-L-グルコン酸は遊離の酸として分離してもよく、またはナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム等の塩として分離してもよい。分離の方法としては、目的に反しない限り、いかなるものでもよい。例えば、必要に応じて反応生成物から過剰、遠

心沈澱、あるいは活性炭処理等を行って菌体を除去した後、この溶液をそのまま濃縮し、析出する結晶を濾取し、更に再結晶させて目的物を取り出す方法、溶媒抽出法、クロマトグラフィー法、塩析法等を単独または、適宜組み合わせ、あるいは反復して利用することもできる。2-ケト-L-グルコン酸が遊離型で得られる場合は、これを適宜の方法によって、例えばナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム等の塩にしてもよく、また塩として得られる場合は、これを適宜の方法によって遊離型あるいは他の塩に変えてもよい。

【0017】本発明の細菌を用いて得られる目的物が、2-ケト-L-グルコン酸であることは、例えば元素分析、融点、旋光度、赤外線スペクトル等の物理化学的諸性質の測定によって同定された。反応液、培養液中に生成した2-ケト-L-グルコン酸の定量は、スルホン化ポリスチレンゲル充填カラム(島津製作所製、SCR-101Hカラム、7.9mm×30cm)を用いる高速液体クロマトグラフィー法(移動相:pH2.2の希硫酸、流量:0.5ml/min、検出器:示差屈折計)で行い、標準品としては、2-ケト-L-グルコン酸ナトリウム1水塩の結晶を使用した。また、2-ケト-L-グルコン酸の検出は、薄層クロマトグラフィー法で行った。セルロースプレート(メルク社製)にサンプルをスポットし、フェノール:水:ギ酸(75:25:5)の溶媒で室温下3時間展開後、プレートを乾燥し発色させると、2-ケト-L-グルコン酸は、硝酸銀試薬では黒褐色の、o-フェニレンジアミン試薬では黄色の、アニリンフタル酸試薬では桃色のスポットをRf値0.3付近に与えることにより検出された。

【0018】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明する。なお、培地の%は、重量/容量%を示す。

実施例1

グルコース2%、ポリペプトン(大五栄養化学社製)1%、酵母エキス0.2%、NaCl 0.5%、寒天1.5%(pH7.2)から成る試験管斜面培地上に28℃、2日間培養したシュドモナス・ソルボキシダンス526-21(IFO14501、FERM P-8750)の菌体1白金耳をグルコース2%、ポリペプトン1%、乾燥酵母0.5%、CaCO₃ 2%から成る培地20mlを200ml容の三角フラスコに分注して、12.1℃、15分間滅菌したものに接種し、28℃、2日間振盪(200rpm)培養して、種培養液を得た。この種培養液2mlを、蒸気滅菌した、ポリペプトン1%、カザミノ酸0.2%、乾燥酵母0.5%、(NH₄)₂SO₄ 0.5%、Na₂S₂O₃・5H₂O 0.05%、KH₂PO₄ 0.03%、MgSO₄・7H₂O 0.05%、FeSO₄・7H₂O 0.1%、MnSO₄・nH₂O 0.0005%、チアミン塩酸塩0.0005%、CaCO₃ 6%、過剰除菌したL-ソルボース15%から成る発酵培地25mlを200ml容の三角フラスコ(滅菌済)に分注したものに接種して、28℃、3

日間振盪培養した。得られた発酵液を高速液体クロマトグラフィーにより分析したところ、54.9mg/mlの2-ケトーレグロン酸(使用糖当りモル収率34.0%)を含んでいた。この発酵液1000mlを遠心沈澱して、菌体等の残渣を除去して得た上澄液980mlをアンバーライトIR120(ローム・アンド・ハース社製、H型、500ml)カラムに通し、ついで、約300mlの脱イオン水で洗浄した。この通過液と洗浄液を合わせて、苛性ソーダでpH6.5に調製した後、50℃で約50mlまで減圧下で濃縮した。この濃縮液を5℃に24時間放置することにより生じた無色柱状の結晶を濾取し、少量の冷メタノールで洗浄後、室温、減圧下に五酸化燐上で乾燥して38.5gの2-ケトーレグロン酸モノナトリウム1水塩を得た。得られた結晶の分析値は、融点:147~155℃、元素分析値($C_6H_9O_7Na \cdot H_2O$): 理論値(C;30.78%, H;4.74%), 測定値(C;30.84%, H;4.89%), 比旋光度: $[\alpha]^{25}_D -23.3^\circ$ (C=1.0、水)で、高速液体クロマトグラフィーの保持時間と薄層クロマトグラフィーのRf値と試薬により発色した色調は、標準品のそれらと一致した。

【0019】実施例2

前記実施例1と同じ方法で、シュードモナス・ソルボソキシダンス526-22(IFO14502、FERM P-8751)の種培養液を得た。この種培養液2mlを、前記実施例1で用いた発酵培地の成分の中で $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ を0.1%に変えた培地25mlを200ml容三角フラスコに分注したものに接種して、30℃、5日間振盪培養した。得られた発酵液中には、72.9mg/mlの2-ケトーレグロン酸が含まれていた。(使用糖当りモル収率45.1%)

【0020】実施例3

前記実施例1と同じ斜面培地に28℃、2日間成育させたシュードモナス・ソルボソキシダンス526-42(IFO14503、FERM P-8752)の菌体1白金耳を、グルコース2%、酵母エキス0.3%、コーンステープリカー0.3%、カゼイン0.5%、 $CaCO_3$ 2%から成る種培地20mlを200ml容三角フラスコに分注して、121℃、15分間蒸気滅菌したものに接種し、28℃にて1日振盪培養して種培養液を得た。この種培養液2mlをコーンステープリカー2%、 $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 0.05%、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%、 $(NH_4)_2SO_4$ 0.3%、FMN0.0001%、ビオチン0.00005%、 $CaCO_3$ 9%から成る培地20mlを分注した200ml容マイヤーに分注し蒸気滅菌したものに接種し、濾過除菌した40%L-ソルボース液を、接種直後に3ml、16時間後に2ml、24時間後に3ml、40時間後に2ml、48時間後に3ml添加しながら30℃、3日間振盪培養した。このようにして得られた発酵液を高速液体クロマトグラフィーにより分析したところ、85.4mg/mlの2-ケトーレグロン酸(使

用糖当りモル収率50.3%;消費糖当りモル収率86.0%)が含まれていた。

【0021】実施例4

実施例1で得られたシュードモナス・ソルボソキシダンス526-21(IFO14501、FERM P-8750)の発酵液1000mlから遠心沈澱して得た沈澱物を約100mlの冷生理食塩水(0.85%)に懸濁し、1000rpm、5分間遠心して、主に $CaCO_3$ から成る沈澱物を除き、上澄を更に9000rpm、10分間遠心沈澱して、洗浄菌体を得た。これを35mlの冷生理食塩水に懸濁したもの8mlに、L-ソルボース600mg、2-(N-モルフォリノ)エタンスルホン酸(MES)緩衝液(pH6.5、0.5M)1mlと $CaCO_3$ 360mgを加え、水で総量20mlとし、200ml容三角フラスコ中で30℃、24時間振盪しながら反応させた。このようにして得られた反応液中には、21.5mg/mlの2-ケトーレグロン酸(使用糖当りモル収率66.5%)が生成していた。

【0022】実施例5

20 シュードモナス・ソルボソキシダンス526-21株をD-ソルビット2.5%、ペプトン1%、酵母エキス1%、炭酸カルシウム0.2%、寒天2%からなる斜面培地に30℃、3日間培養した。この菌体1白金耳をペプトン0.5%、酵母エキス0.5%、 $NaCl$ 0.2%(pH7.0)からなるPY培地5mlを含む試験管に植菌し、28℃、16時間振盪培養した。得られた培養液2mlに、1mgのニトロソグアニジン溶解したPY培地1mlを加え、28℃で30分間保温して変異剤処理した。この処理液を170分間遠心分離(5000rpm)して菌体を集め、これを10mlの新鮮なPY培地に懸濁し遠心分離(5000rpm、10分間)して、洗浄菌体を得た。次に、これを5mlのPY培地に懸濁し、28℃で3時間振盪培養した。得られた培養液をPY培地で適当に希釈後、その0.1mlをL-ソルボース10%と寒天2%を加えたPY培地を含むプレート(直径9cm)に撒き、28℃で7日間培養した。生じたコロニー359個を各々上記斜面培地に移植し28℃、3日間培養した。各々の斜面培地の菌体1白金耳をL-ソルボース10%、コーンステープリカー2%、乾燥酵母0.3%、 $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 0.02%、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%、硫酸0.3%、ペプトン0.2%、 $CaCO_3$ 4%(pH6.6)からなる培地3mlを含む試験管に植菌し、30℃で5日間振盪培養した。得られたこれらの培養液を12000rpmで5分間遠心分離し培養液上清を得る。この上清を希硫酸(0.3N)で5倍に希釈後、再度遠心分離(12000rpm、5分間)して希釈上清を得た。これらの希釈上清1μlをセルロースプレート(メルク社製・米国)にスポットし、フェノール:水:ギ酸(75:25:5)の溶媒系で室温で3時間展開した。このプレートを風乾後、硝酸銀試薬で発色させた。Rf値3.0付近(2-ケトー

レーグロン酸に相当)に最も大きな黒褐色のスポットを与えた株をSB-15株(IFO-14604、FERM BP-1356)として選択した。

【0023】実施例6

実施例5で得たシュードモナス・ソルボソキシダンスSB-15株をD-ソルビット2.5%、ペプトン1%、酵母エキス1%、炭酸カルシウム0.2%、寒天2%(pH7.0)からなる斜面培地に30℃、3日間培養した。この菌体1白金耳を、グルコース2%、ペプトン1%、酵母エキス1%、炭酸カルシウム2%(pH6.8)から成る培地2.0mlを200ml容の三角フラスコに接種し、30℃、2日間振盪培養(200rpm)培養して、第1種培養液を得た。第1種培養液1.5mlを上記と同じ培地を含む同じフラスコに移植し、30℃で2日間振盪培養し、第2種培養液を得た。得られた第2種培養液2mlを蒸気滅菌した。乾燥酵母0.5%、コーンステープリカー2%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、炭酸カルシウム4%、別滅菌したレーソルボース10%からなる発酵培地2.5mlを200ml容の三角フラスコ(滅菌済)に分注したものに移植して30

℃で3日間振盪培養した。得られた発酵液を高速液体クロマトグラフィーにより分析したところ、82.0mg/mlの2-ケトーレーグロン酸を含んでいた。なお、この時、同じ方法で培養した親株526-21株の2-ケトーレーグロン酸生成量は47.1mg/ml(使用糖当りモル収率76.1%)であった。

【0024】実施例7

シュードモナス・ソルボソキシダンスSB-15株を発酵培地中のレーソルボースと CaCO_3 濃度をそれぞれ13%と6%にした以外は、実施例6と同じ方法で培養した。得られた発酵液を高速液体クロマトグラフィーにより分析したところ、84.0mg/mlの2-ケトーレーグロン酸を含んでいた。なお、この時、同じ方法で培養した親株526-21株の2-ケトーレーグロン酸蓄積量は63.8mg/ml(使用糖当りモル収率60.0%)であった。

【0025】

【発明の効果】本発明のシュードモナス・ソルボソキシダンスを用いることにより、レーソルボースから2-ケトーレーグロン酸を収率よく製造することができる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

C12R 1:38)

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所